



TITLE:

Design of Biodegradable Hydrogel Microspheres to Enhance Cell Functions for Cell Aggregates(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Tajima, Shuuhei

CITATION:

Tajima, Shuuhei. Design of Biodegradable Hydrogel Microspheres to Enhance Cell Functions for Cell Aggregates. 京都大学, 2017, 博士(工学)

ISSUE DATE:

2017-09-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20711>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により本文は2019-04-01に公開

(続紙 1)

京都大学	博士（工 学）	氏名	田 島 脩 平
論文題目	Design of Biodegradable Hydrogel Microspheres to Enhance Cell Functions for Cell Aggregates （細胞集合体の細胞機能増強のための生体吸収性ハイドロゲル微粒子のデザイン）		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>本論文は、細胞集合体の細胞機能増強のための生体吸収性ハイドロゲル粒子のデザインを考案し、ハイドロゲル粒子の性質が細胞集合体内の細胞の増殖や分化などの機能に与える影響について調べ、その研究結果をまとめたものであり、2部5章からなっている。緒言では、3次元細胞培養における材料および細胞集合体の重要性について具体例を交えて概説するとともに、研究目的とその背景、および本論文の概説が述べられている。</p> <p>本論文の第1部では、間葉系細胞の集合体内の細胞の機能を高めるためのゼラチンハイドロゲル粒子の性質について検討している。</p> <p>第1章では、粒子径の異なるゼラチンハイドロゲル粒子を含むマウス前骨芽細胞株（MC3T3-E1）細胞集合体を作製し、ゼラチンハイドロゲル粒子の粒子径が、MC3T3-E1細胞の増殖や分化などの機能に与える影響を検討した。ゼラチンハイドロゲル粒子を含まない細胞集合体の場合、集合体内部の細胞は死滅しており、細胞の増殖は見られなかった。対照的に、ゼラチンハイドロゲル粒子を含む細胞集合体の場合、集合体内部の細胞は生存しており、細胞も増殖していた。粒子径の異なるゼラチンハイドロゲル粒子の表面積が一定となる条件で細胞集合体を作製、骨分化培養した時、粒子径が大きい場合は、細胞集合体内の細胞の L-乳酸産生量/グルコース消費量が低くなり、アルカリフォスファターゼ（ALP）活性とカルシウム量が有意に高くなった。ゼラチンハイドロゲル粒子の粒子径が大きい方が、細胞集合体内の細胞の状態がよく、骨分化が促進されることがわかった。</p> <p>第2章では、分解性の異なるゼラチンハイドロゲル粒子を含む MC3T3-E1 細胞集合体を作製し、ゼラチンハイドロゲル粒子の分解性が、MC3T3-E1 細胞の増殖や分化などの機能に与える影響を検討した。分解性の異なるゼラチンハイドロゲル粒子を含む細胞集合体を長期培養した時、分解の速い粒子を用いた場合は、細胞集合体内に粒子の残存がほとんど見られず、細胞集合体内部の細胞が死滅していた。一方、分解の遅い粒子を用いた場合は、細胞集合体内に粒子が多く残存しており、細胞集合体内部の細胞が生存していた。さらに、分解性の異なるゼラチンハイドロゲル粒子を含む細胞集合体を作製して骨分化培養した場合、粒子の分解が遅い場合は、細胞集合体内の細胞の L-乳酸産生量/グルコース消費量が低くなり、ALP 活性とカルシウム量が有意に高くなった。ゼラチンハイドロゲル粒子の分解が遅い方が、細胞集合体内により多くの粒子が残存しており、その結果、粒子を介した栄養酸素の供給が可能となり、細胞の状態がよく、骨分化が促進されることがわかった。</p> <p>第3章では、分解性の異なる骨形成因子-2（BMP2）含浸ゼラチンハイドロゲル粒子を含む MC3T3-E1 細胞集合体を作製し、ゼラチンハイドロゲル粒子からの BMP2 の徐放性が、MC3T3-E1 細胞の分化などの機能に与える影響を検討した。細胞集合体の骨分化培養 1 週間後においては、分解の速いゼラチンハイドロゲル粒子を含む細胞集合体において、細胞の Runt-related transcription factor 2（RUNX2）の mRNA 発現と ALP 活性が高くなった。一方、細胞集合体の骨分化培養 3 週間後においては、分解が中間のゼラチンハイドロゲル粒子を含む細胞集合体において、細胞の ALP 活性とカルシウム量</p>			

京都大学	博士（工 学）	氏名	田 島 脩 平
<p>が高くなった。ゼラチンハイドロゲル粒子の分解性と BMP2 の徐放性が、細胞集合体の骨分化に影響を与えることがわかった。</p> <p>本論文の第 2 部では、上皮細胞のみ、また上皮細胞と間葉系細胞からなる集合体内の細胞の機能を高めるためのマトリゲル粒子やゼラチンハイドロゲル粒子の設計について検討している。</p> <p>第 4 章では、マトリゲル粒子、ゼラチンハイドロゲル粒子、またマトリゲルをコーティングしたゼラチンハイドロゲル粒子を含むマウス乳腺上皮(EpH4)細胞集合体を作製し、粒子の性質が、EpH4 細胞の増殖や分化などの機能に与える影響について、従来の上皮細胞の 3 次元集合体培養方法と比較検討した。細胞集合体の増殖を調べてみると、マトリゲル粒子、ゼラチンハイドロゲル粒子、およびマトリゲルをコーティングしたゼラチンハイドロゲル粒子を含む EpH4 細胞集合体の細胞の増殖は、従来の上皮細胞の 3 次元集合体培養方法と比べて有意に高くなることがわかった。一方、上皮細胞の機能である β-カゼインの発現を調べてみると、マトリゲル粒子を含む EpH4 細胞集合体の細胞の β-カゼインの発現量は、ゼラチンハイドロゲル粒子を含む細胞集合体および従来の上皮細胞の 3 次元集合体培養方法と比較して、有意に高くなることがわかった。</p> <p>第 5 章では、ゼラチンハイドロゲル粒子を含む EpH4 細胞/マウス脂肪前駆(3T3L1)細胞集合体を作製し、ゼラチンハイドロゲル粒子の有無や 2 種類の細胞の相互作用が、EpH4/3T3L1 細胞の増殖や分化などの機能に与える影響を検討している。ゼラチンハイドロゲル粒子への EpH4 細胞接着のため、ゼラチンハイドロゲル粒子を細胞接着分子であるフィブロネクチンで処理した。細胞集合体の増殖と L-乳酸産生量/グルコース消費量比を調べてみると、フィブロネクチン処理ゼラチンハイドロゲル粒子を含む EpH4/3T3L1 細胞集合体は、粒子を含まない EpH4/3T3L1 細胞集合体と比較して、集合体内の細胞の増殖が有意に高くなり、L-乳酸産生量/グルコース消費量比は有意に低くなることがわかった。一方、上皮細胞の機能である β-カゼインの発現を調べてみると、フィブロネクチン処理ゼラチンハイドロゲル粒子を含む EpH4/3T3L1 細胞集合体は、粒子を含まない EpH4/3T3L1 細胞集合体と比較して、細胞の β-カゼインの発現量が有意に高くなることがわかった。</p> <p>以上のことから、生体吸収性ハイドロゲル粒子を含む 3 次元細胞集合体の構築においては、足場となるハイドロゲル粒子の性質が細胞集合体の機能に大きく影響を及ぼすことがわかった。また、3 次元細胞集合体の構築において、細胞の種類や性質にあったハイドロゲル粒子を設計する必要があることがわかった。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、細胞集合体の細胞機能増強のための生体吸収性ハイドロゲル粒子のデザインを考案し、ハイドロゲル粒子の性質が細胞集合体内の細胞の増殖や分化に与える影響について調べたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

ゼラチンハイドロゲル粒子の粒子径や分解性を制御、また分解性の異なるゼラチン粒子に **BMP2** を含浸させるなど、性質の異なるゼラチンハイドロゲル粒子を作製した。得られたゼラチンハイドロゲル粒子を含む **MC3T3-E1** 細胞集合体を作製した結果、1) ゼラチンハイドロゲル粒子の粒子径が大きい方が、細胞集合体内の細胞の状態がよく、骨分化が促進されること、2) ゼラチンハイドロゲル粒子の分解が遅い方が、細胞集合体内により多くの粒子が残存しており、その結果、粒子を介した栄養酸素の供給が可能となり、細胞の状態がよく、骨分化が促進されること、3) ゼラチンハイドロゲル粒子の分解性と **BMP2** の徐放性が、細胞集合体の骨分化に影響を与えることを明らかにした。マトリゲル粒子、ゼラチンハイドロゲル粒子、またマトリゲルをコーティングしたゼラチンハイドロゲル粒子を含む **EpH4** 細胞集合体を作製した結果、4) マトリゲル粒子を含む **EpH4** 細胞集合体の細胞の β -カゼイン発現量は、ゼラチンハイドロゲル粒子を含む細胞集合体および従来の上皮細胞の 3 次元集合体培養方法と比較して、有意に高くなることを明らかにした。ゼラチンハイドロゲル粒子を含む **EpH4** 細胞/3T3L1 細胞集合体を作製した結果、5) ゼラチンハイドロゲル粒子を含む **EpH4**/3T3L1 細胞集合体は、粒子を含まない **EpH4**/3T3L1 細胞集合体と比較して、細胞の β -カゼインの発現量が有意に高くなることを明らかにした。

以上、本論文は、ハイドロゲル粒子を利用した細胞集合体の細胞の増殖や分化制御に関して重要な基礎的知見を与えるものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 29 年 8 月 24 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、(平成 31 年 3 月 31 日までの間) 当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公開可能日： 2017 年 9 月 25 日以降